

REC'D 15 NOV 2000

PCT/JP00/06511

WIPO

PCT

日本国特許庁

22.09.00 #2

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

IP00/6511

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月22日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第269579号

出願人
Applicant(s):

宮坂 信之
上阪 等

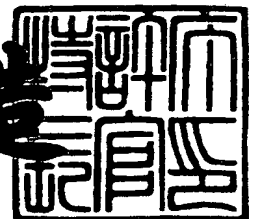
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087585

【書類名】 特許願
 【整理番号】 C1-109
 【提出日】 平成11年 9月22日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区羽根木 2 - 5 - 1 3

【氏名】 宮坂 信之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都杉並区宮前 5 - 8 - 2 4

【氏名】 上阪 等

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都世田谷区羽根木 2 - 5 - 1 3

【氏名又は名称】 宮坂 信之

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都杉並区宮前 5 - 8 - 2 4

【氏名又は名称】 上阪 等

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 $p21^{Cip1}$ リウマチ治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 蛋白質。

【請求項 2】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 蛋白質をコードする DNA。

【請求項 3】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の化合物。

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 活性を促進する化合物

(b) サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 蛋白質の分解を抑制する化合物。

(c) 内因性サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現を促進する化合物。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のタンパク質、請求項 2 に記載の DNA、または請求項 3 に記載の化合物を有効成分とする、慢性関節リウマチの予防または治療のための医薬組成物。

【請求項 5】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該 $p21^{Cip1}$ タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該活性を増加させる化合物

を選択する工程、を含む方法。

【請求項 6】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該 $p21^{Cip1}$ タンパク質量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該 $p21^{Cip1}$ タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 7】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 8】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビター $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) レポーター活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、慢性関節リウマチ炎症を抑制するための分子およびそのスクリーニングに関する。

【0002】

【従来の技術】

慢性関節リウマチは、多数の関節の滑膜炎症を特徴とする。罹患した滑膜組織は、活性化マクロファージ、線維芽細胞、T-およびB-リンパ球を含んでいる。局所で産生されるIL-1 β 、TNF- α 、そしてIL-6のような炎症性サイトカインに反応して滑膜線維芽細胞は増殖し、組織分解酵素を放出する (Arend, W.P. and J.M. Dayer, 1995, Arthritis Rheum. 38:151-160; Feldmann, M. et al., 1996, Cell 85:307-310)。その結果生じたパニヌス組織と呼ばれる過形成滑膜が、罹患関節の軟骨や骨を非可逆的に破壊する。

【0003】

従来の抗リウマチ薬や最近開発された生物試薬のほとんどは、RAに関係する炎症性メディエータの抑制を主なねらいとしている。生物試薬のほとんどは、TNF- α 、IL-1またはIL-6のような炎症性サイトカインを中和することを目的としている (Elliott, M.J. et al., 1994, Lancet. 344:1105-1110; Moreland, L.W. et al., 1997, N. Engl. J. Med. 337:141-147; Campion, G.V. et al., 1996, Arthritis Rheum. 39:1092-1101; Arend, W.P. et al., 1998, Annu. Rev. Immunol. 16:27-55; Yoshizaki, K. et al., 1998, Springer Semin. Immunopathol. 20:247-259)。これに対し本発明者らは、サイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) と呼ばれる細胞周期抑制蛋白を利用して、滑膜線維芽細胞の増殖を直接阻害することにより破壊性の滑膜過形成を予防する研究を行ってきた。

【0004】

CDKIは、それぞれ3～4個のメンバーを含むINK4ファミリーおよびCip/Kipファミリーからなる (Sherr, C.J. and J.M. Roberts., 1995, Genes Dev. 9:1149-1163)。個々のCDKIの発現は個別に調節されていることから、それぞれが細胞周期の制御において独自の役割を果たしていることが示唆されている。INK4ファミリーに属するp16^{INK4a} は、サイクリンDに結合して、サイクリンDがサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) またはCDK6と触媒的に活性なキナーゼ複合体を形成

できないようにする。このように $p16^{INK4a}$ は、 G_1/S 移行期で細胞周期を阻害する (Lukas, J. et al., 1995, Nature 375:503-506; Koh, J. et al., 1995, Nature 375:506-510; Serrano, M., 1997, Exp. Cell Res. 237:7-13)。Cip/Kip ファミリーに属する $p21^{Cip1}$ は、多様なサイクリン/CDK複合体を阻害する (Harper, J.W. et al., 1993, Cell 75:805-816; Xiong, Y. et al., 1993, Nature 366:701-704)。これは、DNAポリメラーゼ δ を活性化する増殖性細胞核抗原 (PCNA) にも結合してこれを不活化する (Flores-Rozas, H. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:8655-8659; Nakanishi, M. et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:17060-17063; Waga, S. et al., 1994, Nature 369:574-578; Li, R. et al., 1994, Nature 371:534-537)。このように、 $p21^{Cip1}$ は細胞周期の様々な段階でサイクリン/CDK複合体のキナーゼ活性を不活化し、同時にDNA複製を阻害する。

【 0 0 0 5 】

本発明者らはこれまでに、CDKIの発現をリウマチの滑膜組織において調べている (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。それらは、核内分子のグループに属する。本発明者らは、慢性関節リウマチの滑膜組織に由来する線維芽細胞がインビボではCDKI $p16^{INK4a}$ を発現しないが、インビトロで線維芽細胞の増殖を阻害すると、それを容易に発現することを見出した。 $p16^{INK4a}$ の誘導は慢性関節リウマチの滑膜線維芽細胞に特異的に認められた。このことから本発明者らは、アデノウイルスを用いて $p16^{INK4a}$ 遺伝子をアジュバント関節炎 (AA) のラットの関節に局所的に移入する実験を行った。この治療により、滑膜過形成そして関連する関節炎の他の病態を抑制することに成功した (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。 $p16^{INK4a}$ 誘導による関節炎の治療は、従来の抗リウマチ薬や最近開発された生物試薬に十分に匹敵するものであった。

【 0 0 0 6 】

一方、 $p21^{Cip1}$ は、 $p16^{INK4a}$ とは異なるファミリーに属するCDKIである。 $p21^{Cip1}$ も $p16^{INK4a}$ と同様、リウマチの滑膜組織に由来する線維芽細胞中でインビボでは発現しないが、インビトロで線維芽細胞の増殖を阻害すると発現が誘導さ

れる。しかし $p21^{Cip1}$ の誘導は、 $p16^{INK4a}$ とは異なり、非リウマチ起源の線維芽細胞にも認められた (Taniguchi, K. et al., 1999, Nature Med. 5:760-767)。また、 $p21^{Cip1}$ は $p16^{INK4a}$ と比べ、サイクリン依存性キナーゼのすべてを阻害する。このように、構造的にも $p16^{INK4a}$ とは区別され、またその発現様式や細胞周期の阻害様式も $p16^{INK4a}$ とは異なる $p21^{Cip1}$ が、慢性関節リウマチに対する治療効果を有するかどうかは知られていなかった。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、炎症性滑膜組織において $p21^{Cip1}$ タンパク質の発現を上昇させることにより抗炎症作用が得られるという知見に基づくものであり、その目的は、滑膜細胞またはその周辺において、 $p21^{Cip1}$ タンパク質の発現や機能を促進することにより、滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制することにある。

より詳しくは、本発明は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための、 $p21^{Cip1}$ タンパク質、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子、および該タンパク質の活性や存在量を増加させる化合物の利用、並びにこれら分子を含む医薬組成物を提供する。さらに、本発明は、 $p21^{Cip1}$ タンパク質の活性や存在量を増加させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、RAの動物モデルであるマウスのコラーゲン誘発関節炎 (CIA) を用い、マウスの炎症性滑膜組織に、 $p16^{INK4a}$ 遺伝子および $p21^{Cip1}$ 遺伝子を強制的に発現させた場合の治療効果を調べる実験を行った。このモデルは、ラットのアジュバント関節炎 (AA) と同様にヒトRAとの顕著な類似性を示す (Courtenay, J.S. et al., 1980, Nature 283:666-668; Wooley, P.H. et al., 1981, J. Exp. Med. 154:688-700; Holmdahl, R. et al., 1988, Lab. Invest. 58:53-60)。この実験により本発明者らは、 $p16^{INK4a}$ ばかりでなく $p21^{Cip1}$ の遺伝子移入により抗関節炎作用が発揮されることを見出した。遺伝子移入により滑膜線維芽細胞が増殖した結果であるパヌス形成は有意に抑制された。また、軟骨また

は骨の破壊も認めなかった。さらに、滑膜組織への単核球の浸潤も同様に抑制された。関節炎が発症した後でも抗関節炎作用は明白であった。

【0009】

本発明者らは、 $p21^{Cip1}$ および $p16^{INK4a}$ 誘導によって滑膜細胞は増殖刺激に対して不応性となるばかりでなく、何らかの抗炎症作用を発揮する可能性があると推測した。これを確かめるため、CIA関節における炎症性サイトカインの発現を調べた。CIAでは、RAと同様に、関節の炎症と軟骨の破壊は、罹患関節におけるIL-1およびTNF- α に依存する。実際にこれらのサイトカインのいずれかに対するモノクローナル抗体 (mAb) を投与すると、関節炎は改善する (Piguet, P.F. et al., 1992, Immunology 77:510-514; Williams, R.O. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9784-9788; Geiger, T. et al., 1993, Clin. Exp. Rheumatol. 11:515-522; Van den Berg, W.B. et al., 1994, Clin. Exp. Immunol. 95:237-243; Thorbecke, G.J. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:7375-7379)。RT-PCRおよび免疫組織化学分析により、これらのサイトカインの発現を調べた結果、 $p16^{INK4a}$ 遺伝子または $p21^{Cip1}$ 遺伝子を導入した関節では、サイトカインの発現が有意に抑制されていることが明らかになった。これらの結果から本発明者らは、リウマチの滑膜組織におけるCDKI遺伝子の発現の誘導、特に $p21^{Cip1}$ の誘導が、RA治療の有効な戦略となりうること、そしてCDKIの異所発現が滑膜の過増殖を防止するのみならず、罹患関節における炎症誘導環境をも緩和することを見出した。また、これらの知見は、 $p16^{INK4a}$ または $p21^{Cip1}$ の発現を選択的に促進する合成化合物等がRAに対する治療試薬としても作用しうることを示唆している。滑膜細胞の異常増殖や滑膜の炎症を制御し得るこのような化合物は、 $p21^{Cip1}$ タンパク質を標的とすることにより効率的にスクリーニングすることができると考えられ、また、 $p21^{Cip1}$ タンパク質や $p21^{Cip1}$ 遺伝子、並びにこのようなスクリーニングにより得られた化合物には、滑膜細胞の異常増殖および／または炎症に起因するRA等の疾患の予防や治療への応用が期待される。

【0010】

本発明は、以上の知見に基づくものであり、より詳しくは、

(1) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 蛋白質、

(2) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 蛋白質をコードするDNA、

(3) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の化合物、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 活性を促進する化合物、

(b) サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 蛋白質の分解を抑制する化合物、

(c) 内因性サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 遺伝子の発現を促進する化合物、

(4) (1) に記載のタンパク質、(2) に記載のDNA、または(3) に記載の化合物を有効成分とする、慢性関節リウマチの予防または治療のための医薬組成物、

(5) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21^{Cip1} タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(6) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングす

る方法であって、

(a) サイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} タンパク質に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21^{Cip1} タンパク質量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21^{Cip1} タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(7) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) 該p21^{Cip1} 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、該p21^{Cip1} 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 内因性のサイクリン依存性キナーゼインヒビター-p21^{Cip1} 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、

(b) レポーター活性を検出する工程、および

(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、を提供するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いるp21^{Cip1} タンパク質および該タンパク質をコードするDNAを提供する。本発明における「滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカイン

の発現を抑制するために用いる」には、滑膜組織（もしくは細胞）の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬としての利用および患者における滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための医薬としての利用が含まれる。炎症性サイトカインとしては、例えば、IL-1 β 、TNF α 、IL-6が挙げられる。

【0012】

本発明において、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いるp21^{Cip1} タンパク質は、天然のタンパク質であっても、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質であってもよい。これらタンパク質は、公知の蛋白質精製技術または遺伝子工学的手法で調製することができる。即ち、天然のタンパク質は、例えば、p21^{Cip1} タンパク質の部分ペプチドに対するの抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、p21^{Cip1} タンパク質発現の高い組織または細胞、例えば、HeLa細胞または継代培養を続けた線維芽細胞から単離し、調製することが可能である。また、組換えタンパク質は、例えば、p21^{Cip1} タンパク質をコードするDNA (Harper, J.W. et al., Cell 1993, 75, 805-816, El-Deiry, W.S. et al., Cell 1993, 75, 817-825 (GenBank U03106)、 Noda, A. et al., Exp Cell Res 1994, 211, 90-98) で形質転換した細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌 (E.coli) が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3 (Invitrogen社) やpEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990, 18(17), p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」 (GIBCO BRL社) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」 (Invitrogen社) などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1 (Pharmacia社)、「QIAexpress system」 (Qiagen社) などが挙げられる。宿主細胞

へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオンリポソームDOTAP(ベーリンガーマンハイム社)やSuperFect (Quiagen社)を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など公知の方法を用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

【0013】

なお、当業者であれば、公知の方法、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などの方法を利用して、p21^{Cip1} タンパク質の活性や安定性を高める等のため、p21^{Cip1} タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿入を容易に行うことができる。このような改変p21^{Cip1} タンパク質も本発明に用いることが可能である。

【0014】

滑膜組織の異常増殖および/または炎症を抑制するために用いるp21^{Cip1} タンパク質をコードするDNAとしては、cDNAであってもゲノムDNAであってもよい。p21^{Cip1} cDNAおよびp21^{Cip1} ゲノムDNAについては、文献 (Harper, J.W. et al., *Cell* 1993, 75, 805-816、El-Deiry, W.S. et al., *Cell* 1993, 75, 817-825 (GenBank U03106)、Noda, A. et al., *Exp Cell Res* 1994, 211, 90-98) に配列が開示されている。

【0015】

p21^{Cip1} cDNAおよびp21^{Cip1} ゲノムDNAは、上記の開示されている配列情報を基にオリゴヌクレオチド (通常、15~50塩基) を合成し、これをプライマーとして、p21^{Cip1} が発現している組織または細胞由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応を行なうことにより増幅し、調製することができる。また、上記の開示されている配列の一部を有するDNA断片をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーション法やコロニーハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリーや

ゲノムライブラリーをスクリーニングすることによってもp21^{Cip1} cDNAおよびp21^{Cip1} ゲノムDNAを調製することができる。cDNAライブラリーとしては、ヒトHeLa細胞由来cDNAライブラリーを用いることができる。また、cDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーは、市販品（CLONTECH社）を用いることもできる。以上のポリメラーゼ連鎖反応やハイブリダイゼーション法は、文献（Sambrook et al., Molecular Cloning(Cold Spring Harbor Lab.)) 等の実験書に記載されている一般的な方法に従って行なうことができる。ポリメラーゼ連鎖反応により増幅したDNA断片やハイブリダイゼーション法によりスクリーニングされたDNA断片は、適当なプラスミドDNAなどにサブクロニングし、発現実験などに用いることができる。

【0016】

また、本発明においては、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために、p21^{Cip1} タンパク質の活性（サイクリン依存性キナーゼ阻害活性およびPCNA阻害活性）を促進する化合物、p21^{Cip1} タンパク質の分解を抑制する化合物、およびp21^{Cip1} 遺伝子の発現を促進する化合物を用いることも可能である。実施例に示すように、関節への局所的なp21^{Cip1} タンパク質の発現が、抗関節炎作用を示すことが見出された。このことから、関節、特に滑膜組織においてp21^{Cip1} タンパク質の存在量や機能を高めることにより、その異常増殖を抑制することができると考えられる。

【0017】

例えば、p21^{Cip1} 発現はDNA損傷に反応してp53転写因子によって、一過性ではあるが直ちに誘導される（Dulic, V. et al., 1994, Cell. 76:1013-1023; El-Deiry, W.S. et al., 1994, Cancer Res. 54:1169-1174）。また、高密度培養または低血清培地のような多様な増殖抑制条件下でも、p53非依存的にp21^{Cip1} 発現が誘導される。様々なヒト細胞株においてp21^{Cip1} を誘導する多くの化合物が既に同定されている。それらの中には、ヒストン脱アセチル化阻害剤である酪酸やTrichostatin A、また、12-O-テトラデカノイルフォルボル-13-アセテート、コレカルシフェロール、レチノイン酸、ミモシン、およびオカダ酸が含まれる(N

akano K. et al., J. Biol Chem., 1997, 272, 22199-22206、Sowa Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 241, 142-150、Alpan, R.S. and A.B. Pardee., 1996, Cell Growth Different. 7:893-901; Jiang, H. et al., 1994, Oncogene 9:3397-3406; Steinman, R.A. et al., 1994, Oncogene 9:3389-3396)。したがって、細胞内のp21^{Cip1} 遺伝子の発現を促進するこれらの化合物は、本発明において好適に用いられ得る。さらに、p21^{Cip1} の誘導は、ファイアースタイン (Firestein) と共同研究者ら (Firestein, G.S. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:10895-10900; Tak, P.P. et al., 1999, Arthritis Rheum. 42:948-953) によって報告された、リウマチ性滑膜組織におけるp53の異常発現を相補する可能性もある。

【0018】

ところで、p21^{Cip1} タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を促進する化合物を調製するためには、p21^{Cip1} タンパク質に被検化合物を接触させて、そのサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を増加させる化合物を選択すれば良い。即ち、p21^{Cip1} タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を促進する化合物は、(a) p21^{Cip1} タンパク質に、被検試料を接触させる工程、(b) p21^{Cip1} タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性を検出する工程、および(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、p21^{Cip1} タンパク質の該活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

【0019】

被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させるp21^{Cip1} タンパク質は、例えば、精製したタンパク質であっても、担体に結合させた形態であってもよい。また、p21^{Cip1} タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させても良い。

【0020】

p21^{Cip1} タンパク質のサイクリン依存性キナーゼ阻害活性は、例えば、Cyclin

/cdkキナーゼによるヒストンのリン酸化活性を測定することにより検出することができる (Matsushime, H. et al., 1994, Mol. Cell. Biol., 14, 2066-2076)

【0021】

p21^{Cip1} タンパク質の分解を抑制する化合物を調製するためには、p21^{Cip1} タンパク質に被検化合物を接触させて、その後のp21^{Cip1} タンパク質量を検出し、p21^{Cip1} タンパク質量の減少を抑制する化合物選択すれば良い。即ち、p21^{Cip1} タンパク質の分解を抑制する化合物は、(a) p21^{Cip1} タンパク質に、被検試料を接触させる工程、(b) p21^{Cip1} タンパク質量を検出する工程、および(c) 被検試料を接触させない場合と比較して、p21^{Cip1} タンパク質量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

【0022】

被検試料としては、上記スクリーニング方法と同様に、特に制限はない。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質であっても、担体に結合させた形態であってもよい。また、p21^{Cip1} タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させても良い。p21^{Cip1} タンパク質の存在量の検出は、例えば、ウェスタンブロッティング法により検出することができる。具体的な方法の一例としては、まず、p21^{Cip1} タンパク質を発現する細胞に被検試料を接触させ、その後、該細胞を溶解し、これをSDS-PAGEに供する。SDS-PAGE後、ゲル上で泳動させたタンパク質をニトロセルロース膜などに転写する。該膜にp21^{Cip1} タンパク質に対する抗体を接触させ、さらに標識した二次抗体を接触させて、該膜上に存在するp21^{Cip1} タンパク質の存在量を検出する。被検試料を接触させなかった細胞を用いた場合(対照)と比較して、p21^{Cip1} タンパク質量を増加させる化合物を選択すれば良い。

【0023】

p21^{Cip1} 遺伝子の発現を促進する化合物を調製するためには、内因性のp21^{Cip1} 遺伝子を発現する細胞に被検試料を接触させ、該遺伝子の発現を増加させる化合物を選択すれば良い。即ち、p21^{Cip1} 遺伝子の発現を促進する化合物は、(a

）内因性の $p21^{Cip1}$ 遺伝子を発現する細胞に、被検試料を接触させる工程、（b） $p21^{Cip1}$ 遺伝子の転写産物量を検出する工程、および（c）被検試料を接触させない場合と比較して、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の転写産物量を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法によりスクリーニングすることが可能である。

【0024】

被検試料としては、上記スクリーニングと同様に、特に制限はない。また、内因性の $p21^{Cip1}$ 遺伝子を発現する細胞としては、例えば、滑膜組織由来の線維芽細胞などの細胞を好適に用いることができるがこれに限定されない。 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の転写産物量の検出は、ノーザンブロッティング法やRT-PCR法などの当業者に公知の手法を用いて行なうことができる。

【0025】

また、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現制御領域の活性化を指標とする方法によって、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現を促進する化合物をスクリーニングすることもできる。効率的なスクリーニングのために、レポーター遺伝子を用いることも可能である。このスクリーニングは、（a） $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを含む細胞に、被検試料を接触させる工程、（b）レポーター活性を検出する工程、および（c）被検試料を接触させない場合と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択する工程、を含む方法により実施することができる。

【0026】

本発明のスクリーニング法においては、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターを構築する。ここで「機能的に結合された」とは、発現制御領域の活性化に応答して、その下流に結合されたレポーター遺伝子が発現しうるように、発現制御領域とレポーター遺伝子が結合していることを指す。レポーター遺伝子としては、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子などを用いることができる。

【0027】

次いで、これを哺乳動物細胞に導入し、被検試料を該細胞株に接触させ、レポ

ーター活性を検出する。被検試料としては、上記スクリーニング方法と同様に、特に制限はない。レポーター活性の検出は、レポーター遺伝子の種類に応じて公知の方法で行なうことができる。その結果、被検試料を接触させない細胞におけるレポーター活性と比較して、レポーター活性を増加させる化合物を選択することにより、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現を促進し、滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制する化合物をスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現をレポーター活性を指標として検出するため、先のノーザンブロットィングやRT-PCR解析などの直接的な検出方法を利用したスクリーニングと比較して、簡便であるという特徴を有する。

【0028】

なお、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子の発現制御領域(プロモーター)については、文献 (El-Dairy, W.S. et al., Cancer Res., 1995, 55 (13), 2910-2919 (GenBank U24170)、Evans, S.C. et al. (GenBank U50603)) において記載されている。また、該発現制御領域を用いた転写制御実験については、文献 (Nakano K. et al., J. Biol Chem., 1997, 272, 22199-22206、Sowa Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 241, 142-150) に記載されている。

【0029】

$p21^{Cip1}$ タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、および上記スクリーニングにより単離される化合物は、滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するための試薬として、また、滑膜組織の異常増殖や炎症が関与する疾患（特に慢性関節リウマチ）の予防や治療のための医薬組成物として利用することができる。滑膜組織の異常増殖および／または炎症が関与する疾患としては、慢性関節リウマチ以外にも、例えば、若年性関節リウマチや関節炎を伴う他のリウマチ性疾患および骨関節症などが考えられる。

【0030】

滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制するための試薬として $p21^{Cip1}$ タンパク質を用いる場合には、 $p21^{Cip1}$ タンパク質は、例えば、マイクロインジェクションなどの方法により滑膜細胞に導入することができる。

【 0 0 3 1 】

p21^{Cip1} タンパク質をコードするDNAを滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制するための試薬として用いる場合、該DNAの発現を滑膜細胞内で保証し得るベクターに該DNAを挿入してこれを滑膜細胞に導入することができる。滑膜細胞へのベクターの導入法としては、例えば、直接注入法、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソーム法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの当業者に公知の方法で行うことが可能である。また、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどのウイルスベクターを用いて導入することもできる。

【 0 0 3 2 】

上記スクリーニングにより単離される化合物を滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制するための試薬として用いる場合、該化合物の形態に応じて、例えば、マイクロインジェクション法（タンパク質などの高分子化合物の場合）、リン酸カルシウム法などの遺伝子導入法（化合物が遺伝子の場合）、滑膜細胞の培養培地への添加などの手法により、該細胞に導入することができる。

【 0 0 3 3 】

また、p21^{Cip1} タンパク質や上記スクリーニングにより得られる化合物を滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制するための医薬組成物として用いる場合には、これらを直接患者に投与（例えば関節内への局所投与）する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【 0 0 3 4 】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0035】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0036】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0037】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。

【0038】

p21^{Cip1} は本来の細胞の代謝回転に必須である細胞周期を阻害する可能性があるため、それらの全身発現は重篤な副作用を誘発する可能性がある。また、p21^C

ip1 の発現を上昇させる化合物の全身投与も、同様に副作用を有する可能性がある。従って、これらの投与においては、その作用が関節等の患部に限局されるようになされることが好ましい。そのためには、関節への局所投与や、ドラッグデリバリーシステムにより作用を患部に限定することが考えられる。

【 0 0 3 9 】

例えば、本発明の薬剤の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、成人（体重60kgとして）においては、一般的には、1日あたり約0.01から1000mg、好ましくは約0.1から100mg、より好ましくは約1.0から50mgである。

【 0 0 4 0 】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、一般的には、1日あたり約1 μ gから100mg、好ましくは約0.01から30mg、より好ましくは約0.1から20mg程度を静脈注射により投与する。

【 0 0 4 1 】

p21^{Cip1} タンパク質をコードするDNAを患者の滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制するための医薬として用いる場合（遺伝子治療用途の場合）、p21^{Cip1} タンパク質をコードするDNAは、適当なベクター、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、あるいはプラスミドDNAなどに組み込み、患者に投与する。投与方法としては、例えば患部への局所投与等の当業者に公知の方法から好ましい方法を適宜選択して行なうことができる。投与方法としては、インビボ法が好適に用いられる。また、遺伝子導入細胞からのパラクリン効果を期待する場合においては、エクスビボ法も用いられ得る。投与において、リン脂質などをミセル化して作製したリポソームに遺伝子を封入することにより、組織移行性、組織吸収性を高めることもできる。またカチオン性の脂質を加え、遺伝子DNAと複合体を形成させることにより、組織移行性、組織吸収性を高めることも可能である。これにより、患者の滑膜組織の異常増殖および／または炎症を抑制することができると考えられる。

【 0 0 4 . 2 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお培養線維芽細胞は、日本医大病院、東京都立墨東病院または府中病院で、総関節置換手術または滑膜切除術を受けた患者のリウマチ性滑膜組織から、を調製した。外科技法の前に患者から同意書を得た。RAの診断は、全米リウマチ学会の基準に従って行った (Arnett, F.C. et al., 1988, *Arthritis Rheum.* 31:315-324)。線維芽細胞は文献の記述通りに培養した (Taniguchi, K. et al., 1999, *Nature Med.* 5:760-767)。また、統計分析はスタットビュー4.5Jソフトウェア (アバカス・コンセプツ、パークレー、カリフォルニア州) によって行った。CIAマウスの足首の幅および足の容積の統計学による差は、スチューデントのt検定によって評価し、疾患のスコアはマン・ホイットニーのU検定によって評価した。

【0043】

〔実施例1〕 p16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子のアデノウイルスによる移入は滑膜細胞の増殖を阻害する

p16^{INK4a} のみならずp21^{Cip1} の強制発現が滑膜細胞に及ぼす抗増殖作用を、ヒト滑膜線維芽細胞を用いて調べた。リウマチの滑膜組織から調製した滑膜線維芽細胞に、p16^{INK4a}、p21^{Cip1}、または細菌LacZをそれぞれ含む、組換え型アデノウイルスAxCap16、AxCap21、またはAxCALacZを感染させた。ヒトp16^{INK4a} 遺伝子 (AxCap16) およびヒトp21^{Cip1} 遺伝子 (AxCap21) を含む複製欠損アデノウイルスは、寺田および伊藤両博士 (東京医科歯科大学、東京、日本) から供与された (Terada, Y. et al., 1997, *J. Am. Soc. Nephrol.* 8:51-60)。lacZ遺伝子 (AxCALacZ) をコードする組換え型アデノウイルスは、斉藤博士 (東京大学、東京、日本) から供与された (Kanegae, Y. et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3816-3821)。高力価組換え型アデノウイルスは、293細胞での増幅によって調製して、塩化セシウム密度勾配遠心によって精製した (Kanegae, Y. et al., 1994, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 47:157-166)。それらの増殖を10%FCSまたは10 ng/ml血小板由来増殖因子 (PDGF) で刺激し、³H-Tdr取り込みの測定により細胞増殖アッセイを行った。組換え型アデノウイルスのインビトロ遺伝子移入およびアデノウイルス感染細胞による³H-Tdr取り込みの測定は、他の文献

に記述されている (Terada, Y. et al., 1997, J. Am. Soc. Nephrol. 8:51-60)。

【0044】

滑膜細胞をAxCAp16またはAxCAp21に感染させると、その増殖はウイルスの力価に依存して抑制された (図1)。AxCALacZでは作用を認めなかった。マウスNIH3T3線維芽細胞を同じウイルスに感染させ、同様に刺激した場合にも、同様の作用を認めた。

【0045】

[実施例2] p16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子誘導がCIAの病態に及ぼす効果
実施例1と同じ組合せのアデノウイルスを用いて、インビボでCIAマウスの滑膜組織においてp16^{INK4a}、p21^{Cip1}、またはLacZ遺伝子を誘導した。

CIAの誘導方法を以下に示す。雄性DBA/1Jマウスを日本チャールス・リバー・ラボラトリーズ社 (東京、日本) から購入して、東京医科歯科大学動物実験施設で収容した。ウシII型コラーゲン (コラーゲン・リサーチ・センター、東京、日本) を0.1M 酢酸に2 mg/mlで溶解して等量のプロイント完全アジュバント (イアトロン社、東京、日本) と乳化した。8週齢のマウスの尾根部に免疫原100 μ lを皮内注射した。3週間後、マウスに同じ抗原を皮下注射した。2回目の免疫から10日以内に関節炎を発症した。

関節へのインビボ遺伝子移入は2回目の免疫と同じ日と10日後、または2回目の免疫の10日後のみのいずれかに行った。すなわち、AxCAp16、AxCAp21、およびAxCALacZアデノウイルスを生理食塩液中で 10^8 粒子/ μ lの濃度で調製し、それぞれのマウスの足首の関節 (関節あたり5 μ l) および膝関節 (関節あたり10 μ l) に両側の関節内注射を行い、そして足根関節 (関節あたり5 μ l) に両側の関節周囲注射を同時に行った。生理食塩液のみの注射を対照とした。

CIA疾患の重症度の評価は、各後肢の関節炎の重症度を以下のように採点することにより行った：0、正常；1、足首関節または足先に限局した紅斑と軽度の腫脹；2、足首から足中央部に及ぶ紅斑と軽度の腫脹；3、足首から中足骨関節に及ぶ紅斑と重度の腫脹；4、関節腫脹を伴う強直性変形 (R sloniec, E.F. et al., 1996, Collagen-induced arthritis, In Current Protcols in Immun log

y., J.E. Coligan et al. eds., John Wiley & Sons, Inc., NY., 15.5.1-24)

。各マウスの疾患スコアは、2本の後肢のスコアの合計として表した。スコア採点は2人の採点者によって盲検的に行った。足首の幅はマイクロメーター（オザキ製造、東京、日本）で測定し、足の容積はTK101体積変動測定計（ユニコム社、千葉、日本）で測定した。後肢のX線写真は、SRO-M30 X-線装置（ソフロン社、東京、日本）を用いて3.5 mAで1分間X線フィルム（富士写真フィルム、東京、日本）への直接露光によって得た。

【0046】

AxCap16, AxCap21, およびAxCALaZアデノウイルスをマウスの足首の関節に注射し、該マウスからRNAを採取し、逆転写酵素によりcDNAに逆転写し、特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った結果、移入した遺伝子のmRNAは、対応する遺伝子を持つ組換え型アデノウイルスを投与した関節に特異的に発現されることが確認された。疾患の経過において、足首の幅、足の容積、そして疾患のスコアを評価したところ、生理食塩液またはLacZ遺伝子を移入した場合と比較して、p16^{INK4a} またはp21^{Cip1} 遺伝子を移入すると、関節炎は有意に改善することが判明した（図2A、BおよびC）。膝関節の腫脹も、これらのCDKI処置マウスでは抑制されることが判明した。疾患のスコアの差は、最初の遺伝子移入後11日目に統計学的有意に達した（ $P < 0.05$ ）。疾患の発病は、生理食塩液処置マウスと比較すると、AxCap16処置マウスでは平均で2.4日、そしてAxCap21処置マウスでは3.4日遅れた。

関節炎発病後のCDKI遺伝子移入の治療効果は、2回目の免疫の10日後、関節の腫脹が明らかになり始めた時期に、CIAマウスを処置することによって調べた。AxCap16またはAxCap21のいずれかによる処置は、関節炎が既に発症した後でもその進行を有意に抑制した（図2D）。

【0047】

2回目の免疫の3週間後の足首関節の放射線試験により、CDKI処置マウスの関節では、組織の腫脹および骨のびらんが顕著に抑制されていることが明らかになった（図3A～E）。同時に、処置した足首についても組織学的に調べた（図3F～J）。組織学的検査では、2回目の免疫の3週後に採取したCIAマウスの後足を10

% 磷酸緩衝ホルマリン (pH 7.4) で固定し、10% EDTA で石灰質を除き、パラフィンに抱埋し、作製した切片 (4 μ m) をヘマトキシリン・エオジンで染色して観察した。AxCap16 または AxCap21 で処置した関節では、AxCALacZ または生理食塩液で処置した関節と比較して滑膜過形成が大きく減少した (図 3I および J)。単核球の滑膜組織への浸潤やパンプスの形成は減少し、軟骨または骨の破壊を認めなかった。

本発明者らが調べた臨床局面と組織学的局面の全てにおいて、AxCap16 で処置した関節と AxCap21 で処置した関節の間に有意差を認めなかった。

【0048】

【実施例 3】 CIA 罹患関節における炎症性サイトカインの発現に及ぼす p16^{INK4a} および p21^{Cip1} 遺伝子誘導の影響

CIA では、RA の場合と同様に、滑膜細胞から主として分泌される TNF- α および IL-1 が、CIA の病理の主な原因である (Piguet, P.F. et al., 1992, Immunology 77:510-514; Williams, R.O. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9784-9788; Wooley, P.H. et al., 1993, J. Immunol. 151:6602-6607; Joosten, L.A.B. et al., 1996, Arthritis Rheum. 39:797-809)。そこで、AxCap16、AxCap21、AxCALacZ アデノウイルスまたは生理食塩液で処置した関節炎関節における、炎症性サイトカインである IL-1 β 、IL-6、および TNF- α の発現を調べた。後足からの滑膜組織を組織病理検査の当日に採取した。これらのサイトカインの mRNA 発現レベルを逆転写 (RT)-PCR によって分析した。

【0049】

逆転写-PCR 分析のために、Isogen (日本ジーン、東京、日本) によって、全 RNA を関節滑膜組織から抽出した。Superscript II 逆転写酵素 (ライフ・テクノロジー社、ガイサースバーグ、メリーランド州) によって相補的 DNA (cDNA) を合成し、グルタルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を増幅する場合には PCR 25 サイクルを行い、そしてヒト p16^{INK4a} および p21^{Cip1}、細菌 lacZ、マウス IL-1 β 、IL-6 および TNF- α cDNA を増幅する場合には、PCR 30 サイクルを行った。PCR サイクルは 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、58 $^{\circ}$ C で 1 分間、そして 72 $^{\circ}$ C で 2 分間実施した。産物をアガロースゲル電気泳動で分画して、エチジウムブロマイドで染色し



た。特異的PCRプライマーの核酸配列は以下の通りである：ヒトp16^{INK4a}、5'-A
AC GCA CCG AAT AGT TAC GG-3' / 配列番号：1 (センス) および5'-GCA TGG TTA
CTG CCT CTG GT-3' / 配列番号：2 (アンチセンス)；ヒトp21^{Cip1}、5'-ACT G
TG ATG CGC TAA TGG C-3' / 配列番号：3 (センス) および5'-ATG GTC TTC CTC
TGC TGT CC-3' / 配列番号：4 (アンチセンス)；細菌lacZ、5'-ACT TAA TCG CC
~~T TGC AGC AC-3' / 配列番号：5 (センス) および5'-CAT CTG AAC TTC AGC CTC~~
CA-3' / 配列番号：6 (アンチセンス)；マウスIL-1 β 、5'-CTG AAA GCT CTC CA
C CTC-3' / 配列番号：7 (センス) および5'-GGT GCT GAT GTA CCA GTT GG-3' /
配列番号：8 (アンチセンス)；マウスIL-6、5'-GAG ACT TCC ATC CAG TTG CC-
3' / 配列番号：9 (センス) および5'-TTC TGC AAG TGC ATC ATC G-3' / 配列番
号：10 (アンチセンス)；マウスTNF- α 、5'-GCC ACC ACG CTC TTC TG-3' / 配
列番号：11 (センス) および5'-ATG GGC TCA TAC CAG GG-3' / 配列番号：12
(アンチセンス)；マウスGAPDH、5'-AAG AAG GTG GTG AAG CAG GC-3' / 配列番
号：13 (センス) および5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' / 配列番号：14
(アンチセンス)。

【0050】

分析の結果、これらのサイトカインmRNAは全て、AxCALacZおよび生理食塩液処
置滑膜組織では豊富であった(図4)。対照的に、AxCap16またはAxCap21で処置
した滑膜組織ではそれらは検出不能であるか、ごく低レベル存在するに過ぎなか
った。mRNA量を抽出RNA量で標準化した。GAPDH mRNAは各群の関節から等しく増
幅された。

【0051】

次に、滑膜組織においてIL-1 β またはTNF- α を発現する細胞を同定するために
免疫組織化学分析を行った。

2回目の免疫の3週後に採取したCIAマウスの後足の膝関節からの滑膜組織を
、オルニチン・カルバミル・トランスフェラーゼ化合物(ティシューテック；マイ
ルス社、エルクハート、インディアナ州)に抱埋して、液体窒素の中で凍結し、
-80℃で保存した。連続凍結切片(8 μ m)を風乾させて、4%冷燐酸緩衝バラホ
ルムアルデヒド(pH 7.4)で固定し、150 mM NaClおよび0.1%サポニンを含む10

mM トリス塩酸 (pH 7.5) で洗浄して、10% 正常ヤギ血清と共にインキュベートした。次にそれらをウサギ抗ヒト IL-1 β (LP-712; ジェンザイム社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州)、ウサギ抗マウス TNF- α 抗体 (IP-400; ジェンザイム社)、または正常ウサギ血清と共に 4℃ で一晩インキュベートした。それらをビオチン結合ヤギ抗ウサギ IgG (サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ、バーミングハム、アラバマ州) と共にインキュベートして、0.3% 過酸化水素のメタノール溶液で処理して、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ベクター・ラボラトリーズ、ビュリントン、カリフォルニア州) と共にインキュベートした。結合した抗体を 0.5 mg/ml の 3,3'-ジアミノベンジジン 4 塩酸の PBS 溶液 (pH 7.4) および 0.02% 過酸化水素によって可視化して、最終的にヘマトキシリンで染色した。

【0052】

AxCALacZ または生理食塩液で処置した関節では、これらのサイトカインは滑膜の関節腔側の層に強く、また、滑膜組織内部にも認められた (図 5A~F)。これとは対照的に、同じ染色技法を行っても、AxCap16 および AxCap21 処置関節の滑膜における IL-1 β または TNF- α の染色は非常に弱かった (図 5G~L)。このように、滑膜組織における炎症性サイトカインの遺伝子転写および放出は、CDKI 処置関節において著しく抑制されていた。

【0053】

【発明の効果】

本発明により、滑膜組織の異常増殖および/または炎症を抑制するための p21^{Cip1} タンパク質、該タンパク質をコードする DNA、および p21^{Cip1} タンパク質の機能や存在量を増加させる化合物が提供された。これら分子は、滑膜組織の異常増殖および/または炎症を抑制するための試薬としての利用が考えられる他、慢性関節リウマチなど、滑膜組織の異常増殖および/または炎症に関連する疾患の予防や治療のための医薬組成物としての応用が期待される。

【0054】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MIYASAKA, Nobuyuki
KOHSAKA, Hitoshi

~~<120> p21(Cip1) used for treatment of rheumatoid arthritis.~~

<130> C1-109

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 1

aacgcaccga atagttacgg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

gcatggttac tgcctctggt

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

actgtgatgc gctaattggc

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

atggtcttcc tctgctgtcc

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

acttaatcgc cttgcagcac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

catctgaact tcagcctcca

20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ctgaaagctc tccacctc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

ggtgctgatg taccagttgg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

gagacttcca tccagttgcc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

ttctgcaagt gcatcatcg

19

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

gccaccacgc tcttctg

17

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

atgggctcat accaggg

17

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

aagaaggtgg tgaagcaggc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

tccaccaccc tgttgctgta

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

慢性関節リウマチ滑膜線維芽細胞の増殖に及ぼすp16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子移入の影響を示す図である。RA患者から採取したヒト滑膜線維芽細胞を、様々な力価のAxCap16、AxCap21、またはAxCALacZアデノウイルスに感染させ、10% FCS(A)または10 ng/ml PDGF+1 %FCS(B)で刺激した。 [³H]-Tdrの取り込みは、感染させないで増殖刺激を行った対照の滑膜線維芽細胞の取り込みと比較して示す。p16^{INK4a} (●) またはp21^{Cip1} (△) の遺伝子移入は、ウイルス力価依存的に細胞増殖を阻害したが、LacZの遺伝子移入 (□) は細胞増殖を阻害しなかった。

【図 2】

CIAの進行に及ぼすp16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子誘導の影響を示す図である。CIAのマウスをAxCap16 (●)、AxCap21 (△)、AxCALacZ (◇) アデノウイルス、または生理食塩液 (黒四角) によって、関節炎発症後2回 (矢印、21日と31日) (A、BおよびC)、または1回限り (矢印、31日) (D) 処置した。動物の足首の幅 (A)、足の容積 (B) そして疾患のスコア (CおよびD) を図示した日に測定した。グラフ上の各点はマウス7匹の平均値±SEMを表す。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.001 (p16^{INK4a} 対生理食塩液)、# P<0.05、## P<0.01、### P<0.001 (p21^{Cip1} 対生理食塩液)。

【図 3】

マウスのCIAに及ぼすp16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子誘導の影響を示す図である。CIAマウスをAxCap16、AxCap21、AxCALacZアデノウイルス、または生理食塩液で2回処置した。2回目の免疫の3週間後に、関節炎関節の放射線検査(A~E)と組織病理検査(F~J)を行った。AとF、正常な足首関節；BとG、生理食塩液処置CIA足首関節；CとH、AxCALacZ処置CIA足首関節；DとI、AxCap16処置CIA足首関節；EとJ、AxCap21処置CIA足首関節。

【図4】

CIA関節における炎症性サイトカインmRNAの発現に及ぼすp16^{INK4a} およびp21^{Cip1} 遺伝子誘導の影響を示す図である。関節をAxCap16、AxCap21、AxCALacZアデノウイルス、または生理食塩液で2回処置した。2回目の免疫の3週間後に1群あたりマウス4匹から採取した後足の滑膜組織におけるIL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CD14、およびGAPDH mRNAの発現を調べた。各RT-PCRアッセイ産物の予想される大きさを括弧内に示す。レーン1~4、生理食塩液処置足首関節；レーン5~8、AxCALacZ処置足首関節；レーン9~12、AxCap16処置足首関節；レーン13~16、AxCap21処置足首関節。

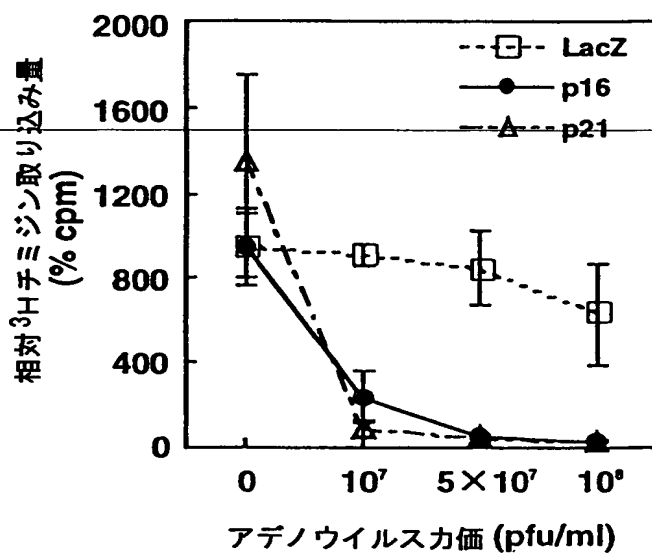
【図5】

CIA関節の滑膜組織におけるIL-1 β およびTNF- α の免疫組織化学分析を示す図である。AxCap16 (G~I)、AxCap21 (J~L)、AxCALacZ (D~F) アデノウイルス、または生理食塩液(A~C)で2回処置したCIA膝関節の滑膜組織を採取して、連続凍結切片を作製した。それらを抗-TNF- α Ab (A、D、GおよびJ)、IL-1 β Ab (B、E、HおよびK)、または正常ウサギ血清(NRS) (C、F、IおよびL)で処理した。結合した抗体をホースラディッシュ・ペルオキシダーゼとその基質で可視化した。

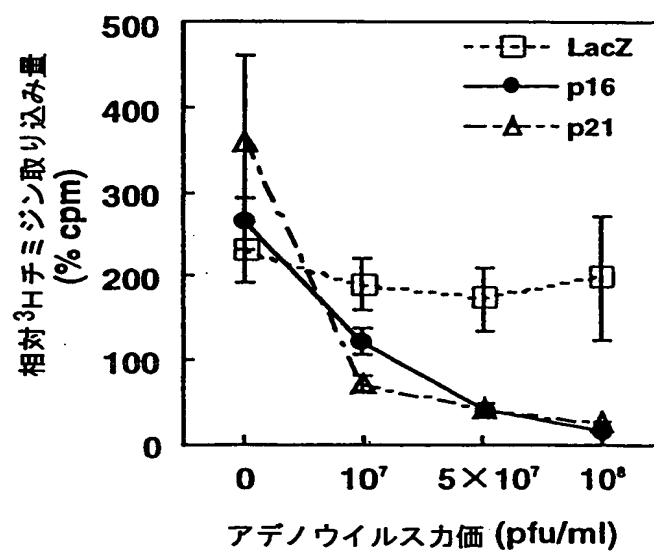
【書類名】 図面

【図 1】

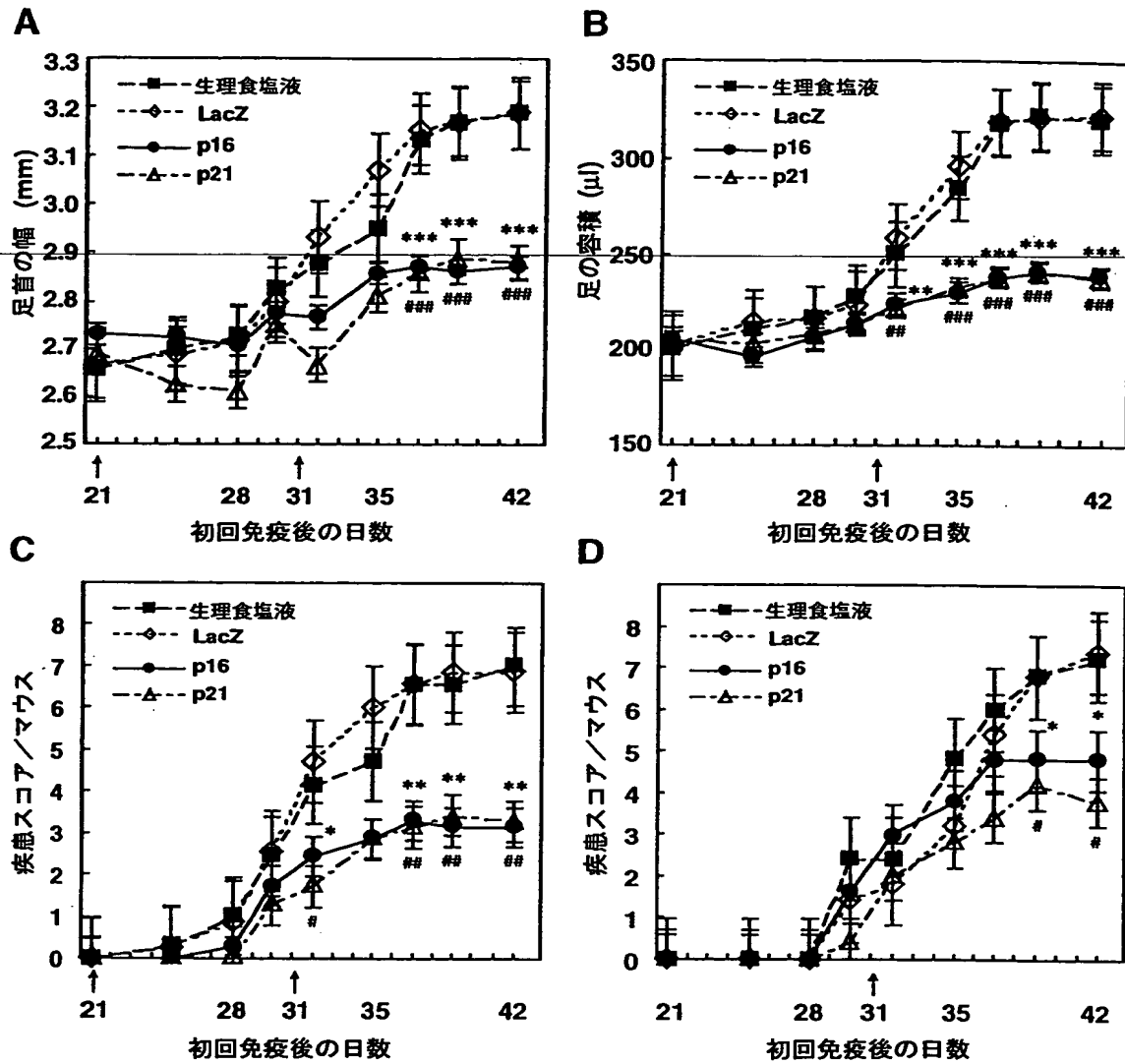
A



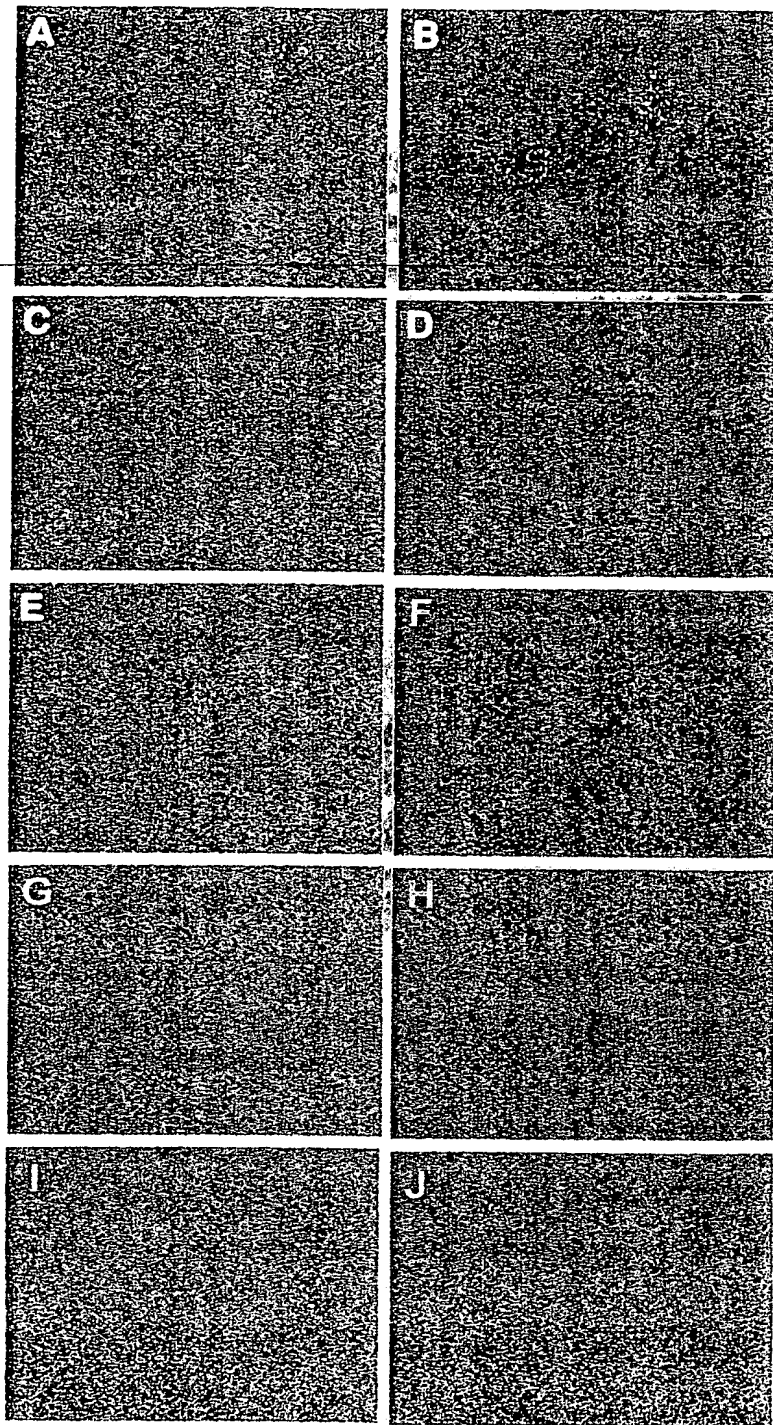
B



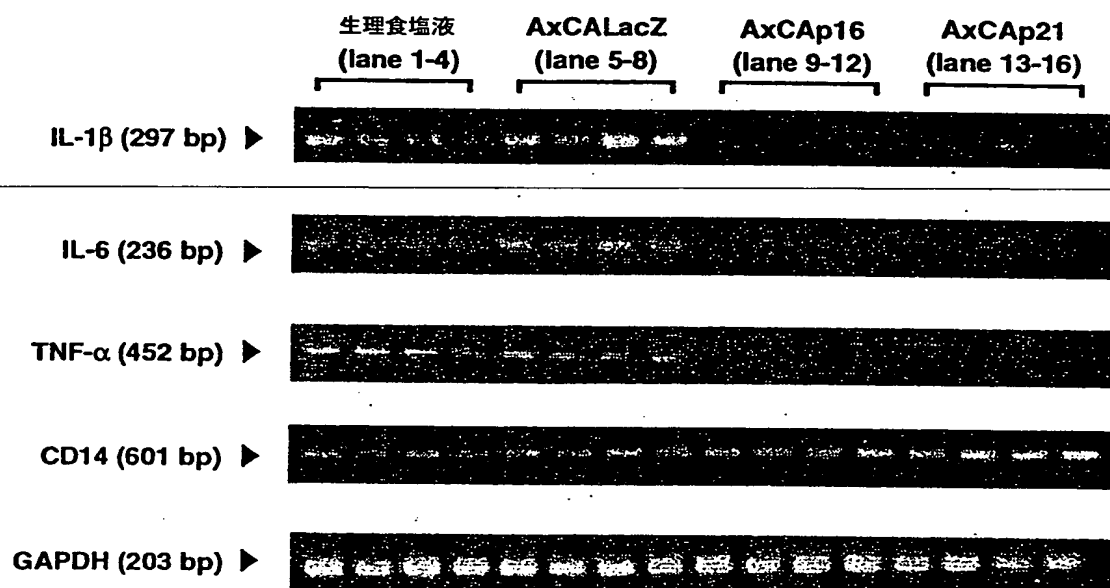
【図 2】



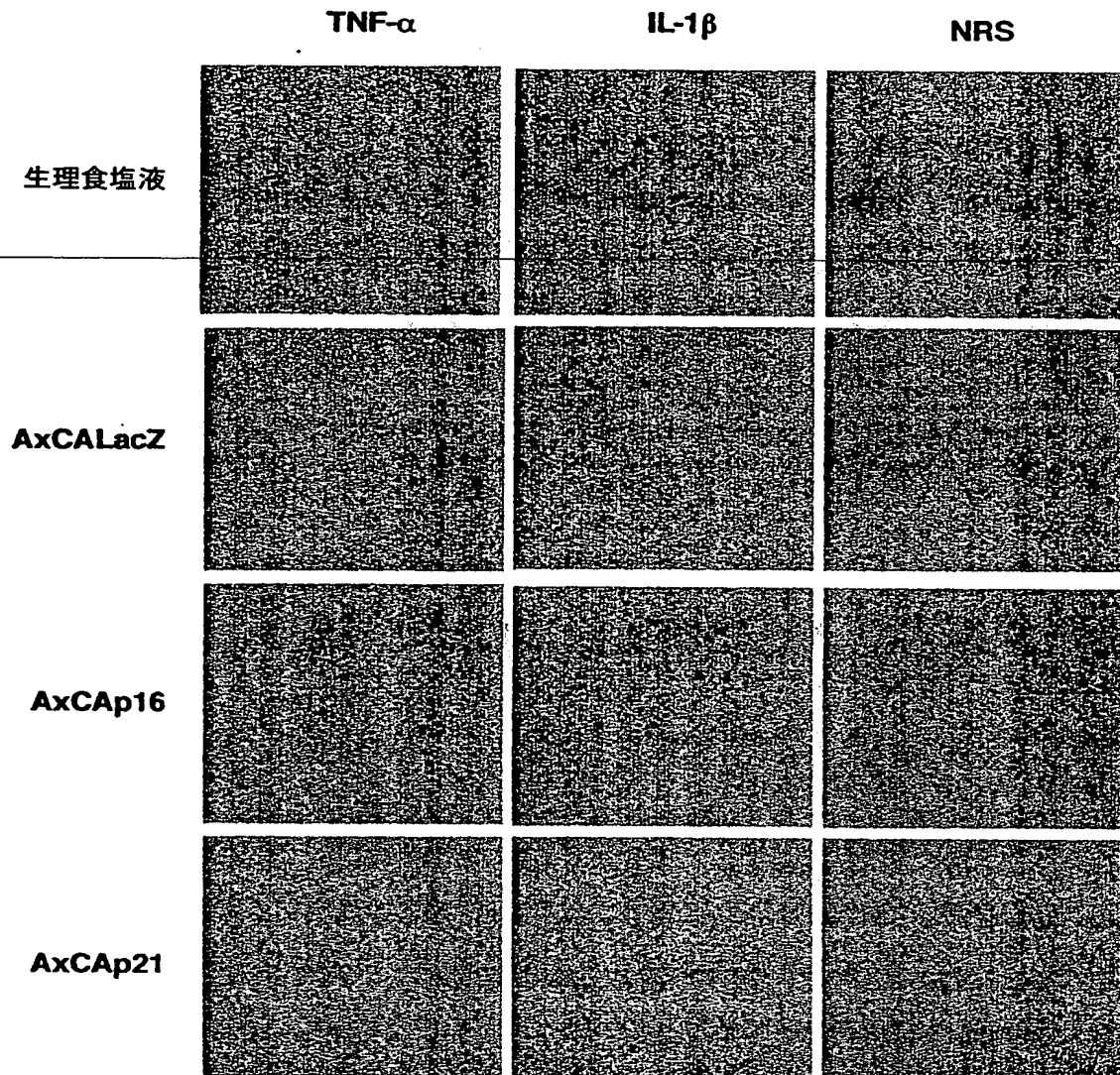
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 滑膜組織の異常増殖、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現を抑制するために用いる $p21^{Cip1}$ タンパク質、 $p21^{Cip1}$ 遺伝子、および該タンパク質の活性や発現を促進する化合物、並びにこれら分子を含む医薬組成物を提供する。さらに、 $p21^{Cip1}$ タンパク質を標的とした、滑膜組織の異常増、滑膜組織の炎症、および／または滑膜組織における炎症性サイトカインの発現する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 アデノウイルスベクターを用いてサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) $p16^{INK4a}$ および $p21^{Cip1}$ タンパク質を関節組織で局所的に発現させることにより、コラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルマウスの発症率および病態を緩和させることに成功した。CDKI導入マウスの滑膜細胞では、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、および $TNF-\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現が抑制されていた。 $p21^{Cip1}$ を用いた遺伝子治療により、慢性関節リウマチなどの予防や治療を行うことが可能となる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 9 1 3 4 5 1 7]

1. 変更年月日	1 9 9 9 年 9 月 2 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都世田谷区羽根木 2 - 5 - 1 3
氏 名	宮坂 信之

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599134528]

1. 変更年月日	1999年 9月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都杉並区宮前5-8-24
氏 名	上阪 等

